





PRECAST GEL SYSTEM FOR TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

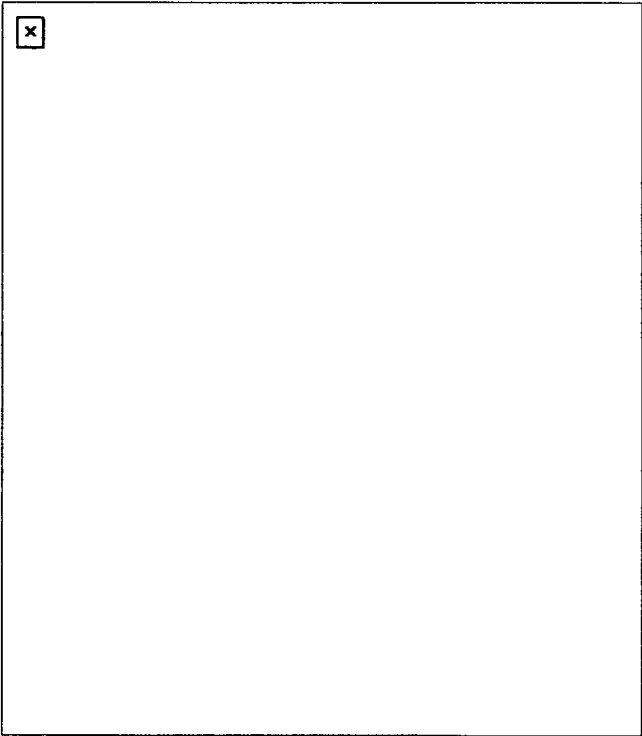
Patent number: JP2151758  
Publication date: 1990-06-11  
Inventor: DENISU FURANSOWA HOTSUCHISUTOR  
Applicant: BIO RAD LABORATORIES  
Classification:  
- international: G01N27/447; G01N27/447; (IPC1-7): B01D57/02; C07K3/14; G01N27/447  
- european: G01N27/447B; G01N27/447C4  
Application number: JP19890227307 19890901  
Priority number(s): US19880267069 19881104

Also published as:  
 EP0366897 (A2)  
 US4874490 (A1)  
 EP0366897 (A3)  
 EP0366897 (B1)

Report a data error here

Abstract of JP2151758

PURPOSE: To separate, for example, a complex protein mixture easily and accurately without gel or dissolved substance being distorted and disturbed by providing a slab gel, a piece-shaped gel solution, and a protection layer.  
CONSTITUTION: When an upper space is placed at a given position, a piece- shaped gel solution 26 is left and is solidified to a gel. When the gel is fully formed, the spacer is loosened. Then, a protection layer 25 is eliminated itself or is left at the site when it is electrically insulated. When the protection layer 25 is in the form of liquid, it is emptied or is sucked and a space is left between two types of gels. Also, the protection layer 25 is a low-melt-point solid or has a melt point within a range of about 25 deg.C to about 75 deg.C. This kind of material is poured in the form of liquid over an upper edge 24 of a slab gel 23, is cooled, and is solidified before the solution 26 is added. Once the latter is solidified, a system is heated again and the protection layer 25 is heated again higher than its melt point, and the layer 25 is returned to liquid shape again and is poured or sucked.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

B5

Patent & Utility Model Concordance

[MENU](#)

[SEARCH](#)

[NEWS](#)

[HELP](#)

Document Number list

	1	2	3	4	5
Application Number	01-227307(1989)				
Unexamined Publication Number	JP,02-151758,A(1990)				
Examined Publication Number					
Registration Number	JP,2701943,B				

Please choose a Kind code with Display Type.

Kind code

Unexamined



Display Type

All Pages



List

Stored Data

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-151758

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)6月11日

G 01 N 27/447  
B 01 D 57/02  
C 07 K 3/14

8318-4H  
8506-2G

G 01 N 27/26

3 1 5 H

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全9頁)

⑭ 発明の名称 二次元電気泳動用プレキャストゲルシステム

⑮ 特 願 平1-227307

⑯ 出 願 平1(1989)9月1日

優先権主張 ⑰ 1988年11月4日 ⑱ 米国(US) ⑲ 267,069

⑳ 発 明 者 デニス フランソワ スイス国、ジュネーブ、コロンジ-ベレリブ 1245 チェ  
ホツチストラサー ミン デ ラ サボニエール 27

㉑ 出 願 人 バイオーラッド ラボ アメリカ合衆国、94547 カリフォルニア州、ハーキュリ  
ラトリーズ インコー ーズ、アルフレッド ノーベル ドライブ 1000  
ボレイテッド

㉒ 代 理 人 弁理士 羽 鳥 修

明 細 書

1. 発明の名称

二次元電気泳動用プレキャストゲルシステム

2. 特許請求の範囲

(1) 細長い片の形の第一のゲル及びスラブの形の第二のゲルよりなり、前記の第一及び第二のゲルは、単一のゲル支持手段上に保持されさらに非導電性且つ可撓性の固体により互いにその上で離れているプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

(2) 細長い片の形の第一のゲル及びスラブの形の第二のゲルよりなり、前記の第一及び第二のゲルは単一のゲル支持手段上に保持されさらにゴムの片により互いにその上で離れているプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

(3) 細長い片の形の第一のゲル及びスラブの形の第二のゲルよりなり、前記の第一及び第二のゲルは単一のゲル支持手段上に保持され、さらに室温で固体でありしかも約25℃と約75℃との間の融点を有する非導電性の材料により互いにその

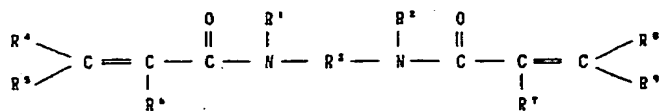
上で離れているプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

(4) 細長い片の形の第一のゲル及びスラブの形の第二のゲルよりなり、前記の第一及び第二のゲルは、単一のゲル支持手段上に保持され、さらに室温で固体でありしかも非水性の溶媒中で室温で可溶な非導電性の材料により、互いにその上で離れているプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

(5) 該ゲル支持手段が一組の実質的に平行な支持板よりなる請求項1～4の何れか一つの項記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

(6) 該ゲル支持手段が、一組の実質的に平行な支持板よりなり、そして前記の第一及び第二のゲルが、該支持板の間に配置されて、前記の第一及び第二のゲルを乱すことなく該支持板から前記の除去可能な電気的に絶縁されている層を除去せしめる開放通路を残す請求項1～4の何れか一つの項記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

(7) 前記の第一及び第二のゲルがポリアクリルアミドゲルであり、前記の第一のゲルが蛋白可溶化量の尿素を含み、前記の第二のゲルが蛋白可溶化量のナトリウムドデシルサルフェートを含み、そして前記の第一のゲル中の該ポリアクリルアミドが式



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は以下の様に規定され、即ち

$\text{R}^1$ 及び $\text{R}^2$ は独立して $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$ アルキルであり、そして $\text{R}^3$ は $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$ アルキレンであるか；又は $\text{R}^1$ 及び $\text{R}^2$ は結合して $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$ アルキレンを形成し、そして $\text{R}^3$ は $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$ アルキレンであるか；又は

$\text{R}^1$ は $\text{R}^2$ に結合して3~10個の炭素原子の飽和ヒドロカルビル基を形成し、それは $\text{R}^1$ 及び $\text{R}^2$ が結合しているN原子と一緒にN含有環を形成し、そして $\text{R}^3$ は $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$ アルキルであるか；又は

(ii) 前記の空いたスペースにゲル形成液体を置いて前記の第一の層に隣接する第二の層を形成し；そして

(iii) 前記の第二の層をゲルに形成することによる請求項8記載の方法。

(10) 該非導電性固体が可撓性材料の片である請求項9記載の方法。

(11) 二次元電気泳動ゲルを注型する方法において、該方法が

(a) 一組の支持板の間に第一のゲルを形成し、前記の第一のゲルの露出した縁に沿って該支持板の間に空いたスペースを残し；

(b) 非導電性の材料を前記の空いたスペースに置いて該スラブの前記の露出した縁に隣接する第一の層を形成し、該非導電性材料が室温で固体でありしかも約25℃と約75℃との間の融点を有するものであり；

(c) ゲル形成液体を前記の空いたスペースに置いて、前記の第一の層に隣接する細長い第二の層を形成し、該物質及び該ゲル形成液体が実質的に

$\text{R}^1$ 及び $\text{R}^2$ は $\text{R}^3$ に結合して7~15個の炭素原子の飽和ヒドロカルビル基を形成し、それはN原子と一緒に2個のN含有環を形成し；そして $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 及び $\text{R}^9$ は独立してH及び $\text{C}_1$ - $\text{C}_2$ アルキルよりなる群から選ばれる)を有する化合物と結合して結合している請求項1~4の何れか一つの項記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

(8) 二次元電気泳動ゲルを注型する方法において、該方法が

(a) スラブの形の第一のゲルをゲル支持体上に形成し、該スラブの露出した縁に沿って該支持体上に空いたスペースを残し；

(b) 除去可能な非導電性の固体により前記の第一のゲルから分離された細長い片の形の前記の空いたスペースに第二のゲルを形成することよりなる方法。

(9) 工程(b)が

(i) 該スラブの前記の露出した縁に隣接する前記の空いたスペースに非導電性の固体を置き；

不混和性であり；

(d) 前記の第二の層を細長いゲルに形成し；そして

(e) 該導電性材料を該融点又はそれより高い温度に加熱し、そして該支持板から液体の状態の該物質を取り出すことよりなる方法。

(12) サンプルを二次元電気泳動により成分に分離する方法において、該方法が

(a) 細長い形状を有する細長い片の形の第一のゲル及びスラブの形の第二のゲルよりなる二次元電気泳動ゲルの配置を提供し、前記の第一及び第二のゲルが単一のゲル支持体上に保持され、そして前記の第一及び第二のゲルが室温で固体でありしかも約25℃と約75℃との間の融点を有する材料の介在領域により分離されており；

(b) 該サンプルを前記の第一のゲル上の一端に載せ；

(c) 前記の細長い形状に平行な方向に前記の第一のゲルの間に電場をかけ、該サンプルの該成分の電気泳動分離をそこで行なってゾーンとし；

(d) 該非導電性材料を該融点より高く加熱し；  
(e) 液体の状態にある間に該非導電性材料を取出し；

(f) 前記の第一のゲルを前記の第二のゲルに向かって移動して前記の第一及び第二のゲルを直接接触させ；そして

(g) 前記の細長い形状を横切る方向に前記の第一及び第二のゲルの両方の間に電場をかけて、前記の第二のゲルの該ゾーンの電気泳動分離を行なう

ことよりなる方法。

(13) サンプルを二次元電気泳動により成分に分離する方法において、該方法が

(a) 細長い形状を有する細長い片の形の第一のゲル及びスラブの形の第二のゲルよりなる二次元電気泳動ゲルの配置を提供し、前記の第一及び第二のゲルが単一のゲル支持手段上に保持され、そして前記の第一及び第二のゲルが室温で固体でありしかも約25℃と約75℃との間の融点を有する材料の介在領域により分離されており；

(b) 該サンプルを前記の第一のゲル上の一隅に載せ；

(c) 前記の細長い形状に平行な方向に前記の第一のゲルの間に電場をかけ、該サンプルの該成分の電気泳動分離をそこで行なってゾーンとし；

(d) 該非導電性材料を該融点より高く加熱し；

(e) 該非導電性材料を液体の状態のある間に導電性ゲル形成液体により置換し；

(f) 該ゲル形成液体を導電性ゲルに形成し；そして

(g) 前記の細長い形状を横切る方向に前記の第一及び第二のゲルの両方の間に電場をかけて、前記の第二のゲルの該ゾーンの電気泳動分離を行なう

ことよりなる方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### [産業上の利用分野]

本発明は二次元ゲル電気泳動に関し、特に二次元のゲル分離に用いられるゲルの製法及び使用方法に関する。

#### [従来の技術及び発明が解決しようとする課題]

二次元電気泳動は、複雑な蛋白混合物を分離するのに広く用いられている。分離を、連続して2種の異なる組の性質に基づいて生じさせることにより、二次元電気泳動は単一段階の分離で得られるそれよりも非常に高い分解能力をもたらす。

技術を用いて種々のやり方で分離パラメータを組合せる。例えば電荷に基づく分離が第一の段階で行なわれ、次に分子量に基づく分離が第二の段階で行なわれる。同様に、一つのゲル濃度における分離の次に、同じゲルの他の濃度における分離がなされる。他の例として、二段階使用によるpHの段階的变化、均一ゲル次に多孔性の勾配ゲル、2種の異なる蛋白溶解剤又は同じ溶解剤の2種の濃度の使用、一つの段階における不連続なバッファ系そして他の段階における連続なバッファ系、そして均一な又は多孔性の勾配電気泳動をとまう等電点電気泳動。このような技術は、血清又は細胞の蛋白、細菌性蛋白、非ヒストンクロマチン蛋白、リボソーム蛋白、リボ核蛋白及びリボ

ソーム蛋白の混合物、核酸及び同様な物質の分離を行なわせしめる。

二次元系の基本的な方法は、細長い又は棒状のゲル例えば5.0mmのオーダーの直径を有するものでの一次元分離で始まり、溶質又は蛋白が棒の長さに沿って位置するゾーンの中に分布するまでゲルの軸に沿って泳動及び分離が生ずる。次にスラブゲルの一つの縁に沿って棒を配置して、棒のゲルの軸を横切る方向に各ゾーンからスラブゲルに溶質の第二の次元の泳動を行なう。

このタイプのやり方で遭遇する困難は、第二の次元の分離を行なうために第一の次元の分離が生じた後の棒状のゲルの移動に関するものである。第一の次元の分離は、棒のゲルが最初注塑された管内で一般に生ずる。第一の次元の分離が完了すると、溶質ゾーンを有するゲルの棒は、物理的な手段例えば抽出により管から取り出され、次にスラブゲルの露出した縁に沿って置かれる。これらの操作は、微妙な取り扱いを必要とし、たとえ非常に注意を働かせても、ゲルを損ないそして溶質

ゾーンの歪みや乱れを生ずる危険が残っている。一度抽出されると、棒のゲルは、スラブゲルと適切に配列され、そして電気的な連続性及びゲル間の妨害されない溶質の移動の両方の目的のために十分に接触される。これらは、誤りの他の源であり再現性を損なう。処理の困難さ並びに不正確さ及び再現性の損失の可能性に加えて、棒のゲルの取り扱い及び配置に要する時間は、操作者の能率を低下させ、どんな致命的な誤りも取り返しのつかない時間とデータの損失を招くことになる。ある人々は、第一の次元の分離にゲルの片を用いるが、同様な困難、誤り及び再現性の損失に遭遇する。

(課題を解決するための手段)

本発明は、プレキャスト (precast) 二次元ゲルシステムに関し、その第一及び第二の次元のゲルは、分離の両方の段階が生ずる単一のゲル支持体上に組み合わされている。支持体は、単一の組の板よりなる囲みであり、適切なスペーサーを有して板の間に空間を設けゲルの厚さを規定する。

触は、直接接触により又は導電性の層の挿入により何れかで達成される。本発明は、分離の2種の段階の間で一つの支持囲みから他のものに棒又は片状ゲルを移動する必要をなくし、それによりゲルの損失及びゾーンの歪みの危険を低下させ、そして不正確さ及び定誤差の発生を減少させることになる。

本発明の他の目的、利点及び特長は、下記の記述から明らかであろう。

第1図は、本発明によるゲルを注型し保持するのに用いられるのに適したゲルの囲みの分解透視図である。

第2図は、第二の次元のゲルの注型直後の一枚の支持板を除いた、第1図のゲルの囲いで製造された二次元ゲルシステムの正面図である。

第3図は、分離の第一の段階中の再び板の一枚を除いた第2図のゲルシステムを示す。

第4a及び4b図は、第二の段階の開始の条件の第2及び3図のゲルシステムを示す。

本発明によれば、片の形の縦長いゲルが、従来

第一及び第二の次元のゲルは、ともに注型され板の間に保持される。第二の次元のゲルは、板間の空間の一部を占めるスラブであり、一方第一の次元はスラブに平行に残りの空間に位置する片であり、ゲルを分ける除去可能な電気的に絶縁する層を有する。又、支持体は、プラスチックのシートよりなるゲル・バックング、ゲル・ボンド又は他の支持材料であり、その上に第一及び第二の次元のゲルがともに注型され、そしてそれらの間に絶縁材料の層又は空気のスペースである絶縁層を有する。

第一の次元の分離は、従って片状ゲルの一端にサンプルを載せ、2種のゲルを互いに電気的に絶縁する一方、長さ方向に片状ゲルの間に電場をかけ、次に電気的に絶縁する層を取出し、2種のゲルをそれらの完全な長さに沿って電気的接触をし、次に第一のそれを横切る方向に両者の間に電場をかけることにより行なわれる。電気的に絶縁する層は、固体、液体又は気体でも良く、そして第二の次元の分離における2種のゲルの間の電気的接

の技術の棒状のゲル又は分離したゲル片の代わりに第一の次元の分離に用いられる。片状ゲルは、スラブゲルの上の浅い層として、スラブゲルと同じやり方で支持板の間に注型される。これは、好ましくはスラブゲルが形成された後になされる。二つの間の絶縁層は、固体、液体又は気体でも良く、片ゲルの注型中に存在するか(この場合、それは又2種のゲル間の流体の接触を防ぐバリヤーとして働く)又は片状ゲルが注型されたならばバリヤー層の代わりとなるの何れかである。

種々の層及びゲルの囲いが、一度第一の次元の分離が完了したとき絶縁層が除かれるようなやり方で、成形されそしてそのような大きさとする。これは、ゲルの囲いの外部と絶縁層の領域とを連絡する開放した通路を設けることにより一般になされる。通路は、好ましくは片状ゲルの一端又は両端の回りのクリアランスの形であり、そこでは絶縁層は排除されることにより外方に押されるか又は取り去られるの何れかである。

添付の図面は、本発明の一つの説明的な態様の

詳しい図を提供する。

第1図は、電気泳動の両方の段階のためのゲルの注型及び使用に用いられるのに適した、分解した形のゲルの図11を示す。図みの構成部品は、2枚のガラス板、一組の側面スペーサー14、15及び上部スペーサー16を含む。側面スペーサー14、15は、従来のスラブゲルの図みにおけるように、ガラス板12、13の間に空間を設け、それにより板間に注型されるゲルの厚さを決める。図示された側面スペーサーは、均一の厚さを有し、同様に均一の厚さのゲルをもたらす。又、スペーサーの長さに沿って変化する厚さを有する側面スペーサー例えば楔形のスペーサーも、垂直方向にゲルの厚さを変える目的で、用いてもよい。

側面スペーサー14、15及びガラス板12、13は、各側面に沿ってクランプ(図示せず)によりサンドウィッチのタイプの配置で互いに保持される。ゲル溶液は、ガラス板と側面スペーサーとの間の空間17に注がれ、従来の方法に従って、ゲルに固化せしめられ、図みは注型用スタンドに

垂直にマウントされる(図示せず)。適当なクランプ、注型用スタンド及びゲルを形成するのに要求される他の器具は、従来広く用いられているものであり、入手可能である。

側面スペーサー14、15は、クランプにより所定位置に固定される。しかし、上部スペーサー16は、除去可能であり、片状ゲルの注型中に用いられる。その使用は、第2図に関してさらに明瞭に示される。

第2図において、第1図の前方のガラス板12は、明瞭さのために除かれる。図に残っているのは、後方のガラス板13、2個の側面スペーサー14、15及び除去可能な上部スペーサー16である。

第1図に戻って、側面スペーサー14、15は、それぞれ内部の空間17に向う肩部21、22を備えることに注意すべきである。この態様では、これらの肩部は、それからスラブゲル23(第2図)が形成される溶液を注ぐための液体のレベルのしるしをつける。スラブゲルの上部の線24は、

従ってこれらの肩部と同一平面にある。スラブゲルを注型するのに、ゲルの図み11は上部スペーサー16を含むことなく組み立てられ、ゲル溶液は肩部21、22のレベルに注がれ固化される。

一度スラブゲル23が十分に形成されると、保護層25がその上に置かれ、その上部の線24をシールする。この保護層は、下記に説明されるように、形及び組成が変化できる。しかし、その種々の形のそれぞれにおいて、それは、その上に置かれるための片状ゲルに用いられるゲル形成溶液に拡散しない物質であろう。上部スペーサー16は、ガラス板間に挿入され図示された位置に置かれる。片状ゲルの溶液は次に加えられて、保護層25の上に層を形成し、保護層は片状ゲル溶液とスラブゲル23との間の全ての接触を実質的に妨げる。

上部スペーサー16は、中心のクロスバー29により接続され、スペーサーの各端から下方にぶらさがった2個の脚部27、28よりなる。上部

スペーサー16は、十分に遠くまで挿入されて、保護層25と片状ゲル溶液26との間の界面30に脚部27、28が延在し、各側面で片状ゲル溶液の層に不連続を残す。図示された態様において、小さなクリアランス31、32は、上部スペーサーの脚部27、28と、肩部21、22の上の側面スペーサー14、15の部分との間に残されることが分かる。これらのクリアランスは、側面スペーサー14、15を乱すことなく上部スペーサー24の挿入及び引抜きの容易さを増すのみの機能を果たす。一度上部スペーサー16が所定の位置におかれたならば、これらのクリアランス領域の片状ゲル溶液は、吸引して除かれるか又は単に放置される。

第2図に示されるように上部スペーサーが所定の位置に置かれると、片状ゲル溶液は放置してゲルに固化される。ゲルが十分に形成されると、上部スペーサー16は除かれる。次に、保護層25は、それ自体除かれるか又はそれが電氣的に絶縁されるならばその場に残される。何れの場合でも

目的は、2種のゲルの間に一つのゲルを他のゲルから電気的に絶縁する介在バリアーを残すことである。もし保護層25が液体の形ならば、それは空けらるか又は吸引されて、2種のゲルの間に空間を残す。例えば、水性ゲルでは、保護層はゲル又はゲル形成溶液の何れかと実質的に不混和性の非極性液体であろう。水より重いクロロホルム及び他の非極性有機溶媒又は油が、この点で使用されよう。又、保護層は、低融点の固体好ましくは約25℃から約75℃の範囲内の融点を有するものであろう。このような材料は、液体の形でスラブゲルの上部の縁24を超えて注がれ、次に冷却され、片状ゲル溶液が加えられる前に固化せしめられる。一度後者が固化すると、システムは再加熱されて保護層をその融点より高くもう一度加熱し、それを液状の形の戻してそれは注がれるか又は吸引できる。この範囲内の沸点を有するステアリン酸メチル及び他の物質がこのような方法に適している。他の方法は、水以外の溶媒に可溶の固体又は重合体の使用である。材料の除去は、従っ

て適切な溶媒を加え得られた溶液を洗い流すことにより行なわれる。さらに他の方法は、可撓性の固体材料例えばゴムの片の使用があり、それは片状ゲル溶液の注入前にスラブゲルの頂部の上に置き、次に片状ゲル溶液が固化し上部スペーサー18が除かれたならば引き出される。ゴム又は他の固体材料は、もちろんスラブゲルと片状ゲル溶液との間の接触を防ぐために両方のガラス板に対して横方向にシールできるほど十分に広くなければならない。

前述のように、もし保護層25が片状ゲル溶液とスラブゲルとの間の混合を防ぐその能力に加えて、電気的に絶縁する材料から作られるならば、それは所定の場所に残すことができる。その結果は、空気よりむしろ固体又は液体の絶縁層であろう。何れの場合でも、結果は2種のゲル間の電流の透過に対するバリアーであり、一端から他端への片状ゲル間に課された全ての電位が片状ゲルそれ自体にその十分な効果を働かせることであろう。上部スペーサー18の取りのぞきは、片状ゲル2

6の2個の端40、41を露出させ、それにより電極バッファーへのそれらの接続を助けて電気泳動分離を生じさせる。

第3図は、第一段階の電気泳動を行なう一つの方法の図である。この態様では、保護層25を除き、ゲルの露出された縁を空気により乾燥し、介在する空間42は空気により占められる。電解質溶液により湿らせられた吸着材料の片43、44は、片状ゲル26のそれぞれの二つの端40、41と接触される。各片の対立する端は、電解質貯槽45、46に浸漬され、それらの間に電位が従来の手段により課される。

分離されるべきサンプルは、任意の従来の手段により片状ゲル28上に載せられる。例えば、サンプルは、2枚の吸着片43、44が片状ゲル26と接触するように置かれる前にこれらの1枚の端に置かれる。第一段階の電気泳動は、次に生じさせられ、溶質は片状ゲルの縁の方向に泳動して、示されたように片状ゲル28に沿って隔てられたゾーンを形成する。

一度第一の次元で所望の程度の分離が生じたならば、2種のゲルは電気的接触をして、全ての単一のゾーンの溶質は互いに分離する。第4a及び4b図は、これを達成する種々のやり方を示す。第4a図では、片状ゲル26が、2種のゲルの間の界面を今や形成するスラブゲルの上部の縁24によりスラブゲル23と十分に接触するまで物理的に押し下げられる。2種のゲルの間に気泡の捕捉がないように注意しなければならない。

第4b図では、片状ゲル28はその初めの位置に放置され、新しい介在ゲル48がそれとスラブゲル23との間に形成される。この介在するゲル48は、導電性であり、しかもそれを通る溶質の泳動を行なわせてスラブゲル23に入らせることができる材料から形成される。この介在ゲルは、適切なゲル形成溶液が片状ゲルの下面に塗るか又は超えるまで片状ゲル28の何れかの側面でゲルの囲みに注ぐことにより形成でき、固体化すると気泡が捕捉されることなく2種のゲルの間に十分に接触する。介在ゲル48は、スラブゲルと同



じ材料又はこれらの結果をもたらす任意の他の材料のものである。

前述の方法は、プラスチック・バックイング又はゲル・ボンド上で重合されたゲルに等しく適用できる。

一度電氣的接触が片状ゲル28及びスラブゲル23の間になされたならば、片状ゲルの上部の線50及びスラブゲルの下部の線51は、第二段階の電気泳動を行なうために電極バッファと接触して置かれ、片状ゲルからスラブゲルへの下方の泳動をもたらす。これは、広く市販され当業者に周知の従来のスラブ電気泳動セルの使用により達成できる。このようなセルの一つの例は、米国特許第4575040号に開示されており、ここに参考文献として引用する。一度第二の次元で所望の程度分離が生ずると、スラブゲルは固みから取り出され、従来の方法に従って分析される。これらは、一般にゲルの染色及び乾燥、次に得られた溶質パターンの定量的又は定性的測定の何れかを含む。

即ち

$R^1$ 及び $R^2$ は独立して $C_1-C$ アルキルでありそして $R^3$ は $C_1-C$ アルキレンであるか；又は $R^1$ 及び $R^2$ は結合して $C_1-C$ アルキレンを形成しそして $R^3$ は $C_1-C$ アルキレンであるか；又は

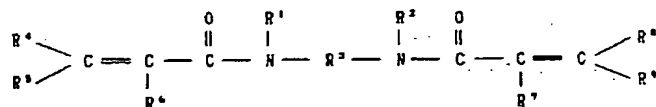
$R^1$ は $R^2$ に結合して3～10個の炭素原子の飽和ヒドロカルビル基を形成しそれは $R^1$ 及び $R^2$ が結合しているN原子と一緒にN含有環を形成し、そして $R^3$ は $C_1-C$ アルキルであるか；又は

$R^1$ 及び $R^2$ は $R^3$ に結合して7～15個の炭素原子の飽和ヒドロカルビル基を形成しそれはN原子と一緒に2個のN含有環を形成し；そして

$R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 及び $R^9$ は、独立してH及び $C_1-C$ アルキルよりなる群から選ばれる。

特に有用なシステムでは、片状ゲルは、ジアクリリルビペラジンにより橋かけ結合したポリアクリルアミドゲルであり、蛋白可溶化量で尿素を含み、そしてジアクリリルビペラジンにより橋かけ

本発明に従って用いられるゲルは、二次元電気泳動分離に好適に用いられるゲルの任意の組合せである。ゲルは、一般にポリアクリルアミドゲル、澱粉ゲル、アガーゲルなどを含む水性ゲルであり、種々のゲル濃度及び多孔度、均一な濃度又は勾配、一定の又は勾配のpHを用い、可溶化剤を用い又は用いることなく或いは用いるときには種々のタイプ及び濃度の可溶化剤を用い、そして連続又は不連続のバッファースystemを使用する。これらのシステムが用いられる種々の適用の中で、第一の次元が等電点電気泳動であり、第二の次元が一定pH電気泳動である分離がある。システムは、又第一の次元が尿素の存在下でなされる分離に用いられる。この点において、下記の式の橋かけ結合剤により橋かけ結合したポリアクリルアミドゲルが特に有用である。



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は以下の様に規定され、

結合したポリアクリルアミドゲルでもあるスラブゲルは、尿素の代わりに又はそれに加えて、蛋白可溶化量でナトリウムドデシルサルフェートを含む。

何れの場合において用語「蛋白可溶化量」は、サンプル中の蛋白を水性相に可溶にする任意の量を示すのにここでは用いられる。尿素の場合では、量は一般に約2M～約25M好ましくは約8M～約10Mに及ぶ。ナトリウムドデシルサルフェートの場合では、量は一般に約0.03重量%～約3重量%に及ぶ。他の可溶化剤は、ホルムアミド及び酢酸を含む。適切な可溶化剤及びその最適な量の選択は、分離される蛋白又は溶質の性質及びサンプル中のそれらの濃度に応じて変化し、そして当業者の技術の範囲内に十分に入る。

前述は、説明のために主として述べられた。ここに記載された材料、方法及び操作条件の変化、修正及び置換は、本発明の趣旨及び範囲から離れることなくできることは当業者にとり容易に明らかであろう。

## 〔発明の効果〕

本発明の二次元電気泳動用プレキャストゲルシステムによれば、ゲル及び溶質ゾーンの歪みや乱れが生じることがなく、複雑な蛋白混合物等を容易且つ正確に分離できる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明によるゲルを注型し保持するのに用いられるのに適したゲルの囲いの分解透視図である。

第2図は、第二の次元のゲルの注型直後の一枚の支持板を除いた、第1図のゲルの囲いで製造された二次元ゲルシステムの正面図である。

第3図は、分離の第一の段階中の再び板の一枚を除いた第2図のゲルシステムを示す。

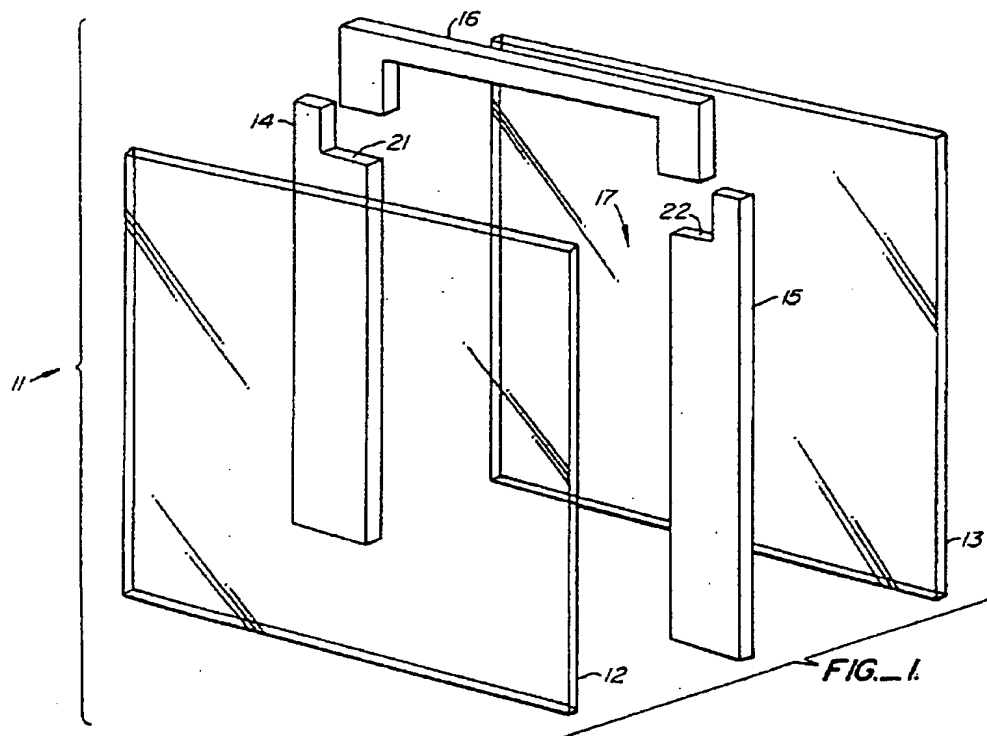
第4a及び4b図は、第二の段階の開始の条件の第2及び3図のゲルシステムを示す。

- |            |            |
|------------|------------|
| 11…ゲルの囲み   | 12…ガラス板    |
| 13…ガラス板    | 14…側面スペーサー |
| 15…側面スペーサー | 16…上部スペーサー |
| 17…内部空間    | 21…肩部      |
|            | 22…肩部      |

- |            |           |
|------------|-----------|
| 22…肩部      | 23…スラブゲル  |
| 24…23の上部の縁 | 25…保護層    |
| 26…片状ゲル溶液  | 27…16の脚部  |
| 28…16の脚部   | 29…クロスバー  |
| 30…界面      | 31…クリアランス |
| 32…クリアランス  | 40…26の端   |
| 41…26の端    | 42…介在空間   |
| 43…片       | 44…片      |
| 45…電解質貯槽   | 46…電解質貯槽  |
| 47…ゾーン     | 48…介在ゲル   |
| 50…26の上部縁  | 51…23の下部縁 |

特許出願人 バイオラッド ラボラトリーズ  
インコーポレイテッド

代理人 弁理士 羽 鳥 修



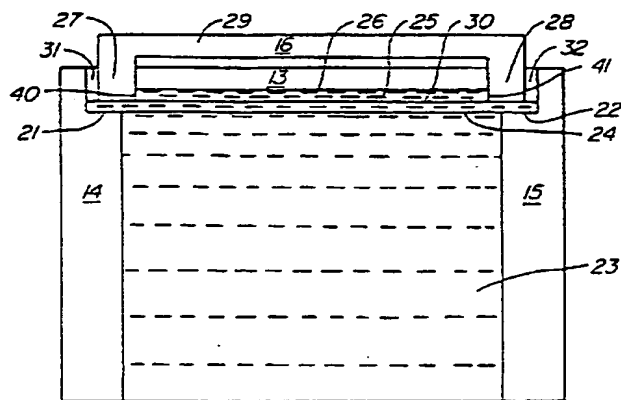


FIG. 2.

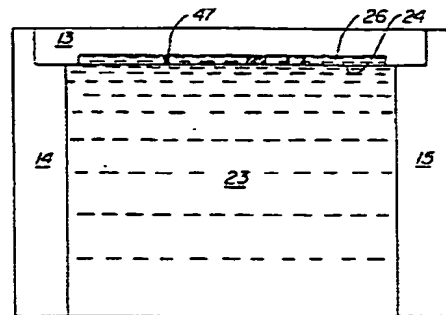


FIG. 4a.

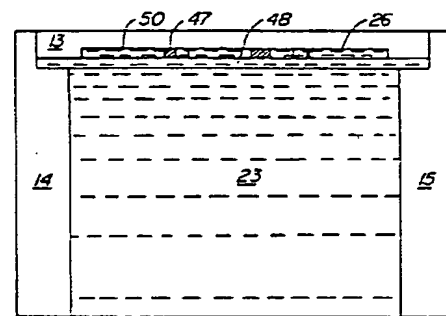


FIG. 4b.

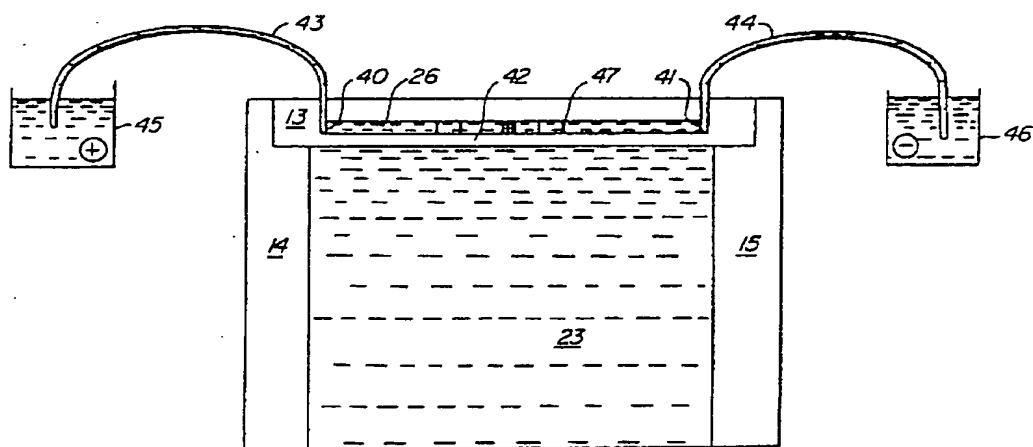


FIG. 3.